

Génétique cellulaire

M. François JACOB, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Le cours de cette année était intitulé « Gènes et développement embryonnaire ». Il visait principalement à discuter les mécanismes qui président la régulation de l'activité génique au cours du développement.

L'évolution ne crée rien du néant. Elle travaille avec ce qui existe déjà. D'où l'importance d'étudier très en détail les systèmes les plus simples. On a donc tout d'abord rappelé les observations faites chez les bactéries et le modèle qui en avait été déduit il y a quelque trente ans. Mais depuis lors ces mécanismes se sont compliqués. Dans le système lactose d'*Escherichia coli*, par exemple, Benno Müller Hill et son équipe ont mis en évidence l'existence de trois opérateurs O1, O2 et O3. O1 est placé à l'extrémité N-terminale du gène lacZ ; O3 à 92 paires de bases en amont (3') et O2 à 401 paires de bases en aval (5') de O1. En présence des trois opérateurs, le coefficient de répression est d'environ 1 300. Sans O2 ou O3, il est de 500 à 700. Sans O2 ni O3, il n'est plus que de 18. L'explication semble être que le répresseur agit sous forme de tétramère qui se fixe de manière coopérative sur deux opérateurs, O1 et l'un des deux autres. Cette hypothèse implique une courbure de l'ADN permettant à deux des opérateurs de se placer en face l'un de l'autre par l'intermédiaire du répresseur tétramère.

De même, le système de répression alternatif CI-cro chez le phage λ s'est également compliqué. Mark Ptashne a montré l'existence de trois opérateurs très voisins : O1, O2 et O3. Chaque molécule de répresseur est un dimère. Deux dimères se fixent de façon coopérative sur O1 et O2 empêchant la polymérase de se placer sur le promoteur de transcription des gènes nécessaires à la replication végétative du phage, mais activant la polymérase fixée sur le promoteur de transcription du gène régulateur CI. Le système est agencé de façon telle que le répresseur fixé sur O2 vient au contact d'un élément de la polymérase ce qui active cette dernière.

On a ensuite discuté les propriétés de la polymérase II impliquée dans la transcription de la plupart des gènes des systèmes eucaryotes. On a rappelé la structure de cette polymérase et la nécessité d'une série de facteurs « généraux » : TFII A, B, C, D, E, F et S. A côté de ces facteurs généraux, interviennent le plus souvent des facteurs plus spécifiques, dits « facteurs d'activation ». Ces facteurs d'activation sont des protéines à modules, où la région d'activation, comme la région de fixation à l'ADN, sont interchangeables. La plupart de ces protéines agissent comme dimères et possèdent aussi un domaine de dimérisation. On a alors discuté en détail des propriétés des différentes familles d'activateurs transcriptionnels connus.

Dans une seconde partie, on a montré le rôle de ces activateurs dans le développement embryonnaire. On a surtout discuté le cas de la *Drosophile* qui, pour des raisons évidentes, est de loin le mieux connu. Après avoir décrit les principales étapes du développement embryonnaire chez la *Drosophile* et les types de gènes impliqués, on s'est intéressé plus spécifiquement aux stades précoces de ce développement. En particulier, aux gènes d'expression maternelle, qui mettent en place dans l'œuf le plan du futur organisme avec un axe antéro-postérieur et un axe dorso-ventral. Cette analyse a été menée en détail, grâce à l'isolement de nombreux mutants maternels, notamment dans le laboratoire de Christiane Nüsslein-Volhard.

Une quarantaine de gènes intervenant dans la mise en place du plan du futur organisme ont été repérés. Le mieux connu est le gène « bicoïd » (*bic*) qui joue un rôle important dans la mise en place de la région antérieure de l'axe antéro-postérieur. Ce gène « bicoïd » est exprimé dans les cellules nourricières qui entourent l'ovocyte et l'équipent en matériaux divers. Les cellules nourricières placées en avant de l'ovocyte injectent dans le pôle antérieur de ce dernier des ARN messagers. Ces messagers sont piégés dans un réseau de protéines dont l'expression est gouvernée par deux autres gènes à expression maternelle. Les ARN messagers restent ainsi au pôle antérieur de l'ovocyte sans être traduits en protéine. La traduction ne commence qu'après fécondation et éclosion de l'œuf. Elle s'effectue quand l'œuf est encore un syncytium et il s'établit un gradient linéaire de protéine *bic*. Cette protéine *bic* est un activateur de transcription. Il intervient dans la transcription des gènes zygotiques les plus précoces — gènes dits « gap ». Les protéines ainsi formées sont également des facteurs qui interviennent dans la transcription des gènes de la série suivante — ou gènes « pair rules ». Et ainsi de suite. On a ensuite discuté les trois autres systèmes qui concourent à la mise en place des axes de l'organisme. Comme le système antérieur « bic », les autres systèmes mettent en jeu des batteries de gène. L'un de ces gènes sert de signal de position. Un autre est un activateur de transcription.

Beaucoup de ces gènes possèdent un motif commun dit « homéoboîte » qui représente le site de fixation sur l'ADN de ces facteurs de régulation. Il a été

montré par Walter Gehring que ces motifs sont très conservés au cours de l'évolution. Des ADN de *Drosophile* utilisés comme sonde ont ainsi donné accès à certains systèmes génétiques de régulation intervenant dans le développement des mammifères, Souris et Homme. On a discuté l'état actuel des connaissances concernant ces gènes. L'étude de ces structures montre une fois de plus le bricolage qui intervient au cours de l'évolution pour faire du neuf avec du vieux.

F. J.

SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires sur certains aspects moléculaires du développement embryonnaire.

M. Alphonse LE CAM, Directeur de Recherche au CNRS, a présenté un exposé sur les inhibiteurs naturels des activités tyrosine-kinase associées aux récepteurs des facteurs de croissance.

M. Jacques PIETTE, Chargé de recherche au CNRS, a décrit les gènes myogéniques impliqués dans la transcription spécifique des cellules musculaires.

M. Jacques GHYSDAEL, Directeur de recherches au CNRS, a fait un séminaire sur « Modes d'action des oncogènes *v-erbA* et *v-ets* ; détournement de la fonction des facteur transcriptionnels *ErbA* et *Ets-1* ».

M. Claude KEDINGER, Professeur à l'Université Louis Pasteur à Strasbourg, a fait le point sur l'adénovirus, un système modèle pour l'étude des mécanismes contrôlant l'expression des gènes eucaryotes.

M. Denis DUBOULE, Chef de laboratoire à l'EMBL, a fait un exposé sur « Les gènes *HOX* : vers une approche moléculaire de la morphogénèse des mammifères ».

M. Pierre SPIERER, Professeur à l'Université de Genève, a fait un séminaire sur « Un mécanisme nouveau de contrôle génique ? Empaquetage et inactivation du chromosome par une protéine à doigt de zinc chez la mouche *Drosophile* ».

M. Benoît ROBERT, Chargé de recherche à l'Institut Pasteur, a fait le point sur « Le développement de la patte chez les Vertébrés : rôle du gène *HOX 7* ? »

M^{me} Marie-Anne FÉLIX, Chargée de recherches au CNRS, a discuté du contrôle du cycle cellulaire dans l'embryon précoce de *Xénope*.

M^{me} Anne DEJEAN, Directeur de recherches à l'INSERM, a fait le point sur les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque et oncogénèse.

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Au cours de l'année écoulée, l'étude de la différenciation s'est poursuivie dans le laboratoire situé à l'Institut Pasteur. Comme précédemment, cette étude met en jeu deux matériels : le tératocarcinome de la Souris et les embryons de Souris aux stades précoces de leur développement. C'est en comparant ces deux matériels qu'on espère pouvoir analyser les premiers stades du développement embryonnaire.

ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DE L'EMBRYON DE SOURIS

Les recherches de l'Unité de Génétique cellulaire sont centrées sur l'étude du développement de l'embryon chez la Souris pendant les stades les plus précoces. On s'y attache plus précisément à l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ce développement. Le groupe qui travaillait sur la *Drosophile* s'est individualisé et ne fait plus partie de l'unité. En revanche, certaines études ont été commencées sur un nouveau matériel : le Poisson-Zèbre.

I. MUTAGENÈSE DIRIGÉE CHEZ LA SOURIS

(Philippe BRÛLET, Laurent COEN, François CONQUET, Jean-Louis ESCARY, Tom HOLLON, Yvan LALLEMAND et Hervé LE MOUËLLIC)

Une analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent le développement des mammifères peut être désormais entreprise par mutagenèse. Cette mutagenèse dirigée est basée sur une recombinaison dans les cellules embryonnaires souches (ES). La cellule ES recombinée est réimplantée dans l'embryon et permettra la création d'une lignée de Souris mutantes. Cette étude a montré qu'un gène quelconque peut désormais être remplacé dans le génome murin. En fonction de la nature du couple gène remplacé et remplaçant, diverses études sont possibles. En particulier, si le gène remplaçant est le LacZ de la β -galactosidase de *E. coli*, les effets de l'inactivation du gène peuvent être évalués directement *in situ* au niveau cellulaire. Après recombinaison, le gène de la β -galactosidase se retrouve sous la commande du promoteur du gène muté. L'apparition du phénotype peut être suivie peu à peu au cours de l'embryogénèse dans différents contextes génétiques. Cette technique de remplacement permet de suivre les effets de mutations homozygotes et/ou létales. Combinée avec des expériences de transplantation, elle offre un moyen unique d'établir des corrélations entre l'activité d'un promoteur spécifique et la détermination des cellules embryonnaires. Un tel rempla-

cement par LacZ a été effectué dans le cas du facteur de croissance des cellules embryonnaires, le LIF, et dans le cas d'un homéogène murin, Hox-3.1. Les animaux mutants devraient permettre d'établir le rôle respectif de ces gènes lors de la régionalisation de l'ectoderme embryonnaire et après la gastrulation, lors de la mise en place de l'axe antéro-postérieur.

Si, dans le processus de remplacement génique, on utilise un oncogène conditionnel, on peut tenter d'immortaliser des cellules précurseurs. Sous la commande du promoteur choisi, l'oncogène sera transcrit à un moment précis du développement dans une cellule précurseur d'un lignage cellulaire donné. Une modification du génome *in vitro* pourra alors être effectuée avant réimplantation dans un embryon dans un but de thérapie génique. Une telle méthode d'ablation génique est utilisée avec l'anti-oncogène p53 et l'oncogène N-ras.

Une étude sur la colonisation de l'embryon par les cellules ES a permis d'optimiser les conditions d'injection des cellules ES. Des taux de chimérisme reproductibles supérieurs à 90 % sont obtenus lors d'injection dans les morules.

II. TRANSCRIPTION DES GÈNES DE CHOC THERMIQUE

(Olivier BENSAUDE, Michel MORANGE et Valérie MEZGER)

a) *Variation du facteur HSF au cours de l'embryogénèse précoce des mammifères*

La transcription des gènes de choc thermique varie de manière importante pendant les premières phases du développement embryonnaire. Des modifications de transcription sont aussi observées dans les cellules de carcinome embryonnaire, et y sont corrélées à une modification du facteur HSF, observable par la technique du gel retard. Des études directes du facteur HSF présent dans les embryons précoces de Souris, utilisant la même technique du gel retard, nous ont permis de suivre les variations d'état du facteur HSF, au cours de l'embryogénèse précoce, entre la fécondation et le stade blastocyste.

b) *Activation par le choc thermique d'une protéine-kinase susceptible de phosphoryler l'ARN polymérase II*

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent, lors d'un choc thermique, à la modification de l'état de la chromatine et à l'inhibition générale de la transcription, nous avons suivi la modification d'une activité protéine-kinase particulière ; la CTD kinase. (Le CTD est le domaine C-terminal de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II ; ce domaine est constitué de plusieurs dizaines de répétition d'un même motif de 7 acides

aminés). Dans les lysats de cellules humaines ou murines, on trouve une activité CTD kinase stimulée d'un facteur 10 par le choc thermique. Cette kinase ne possède pas d'activité H1 kinase et n'est pas reconnue par des anticorps anti cdc2. Cette kinase est activée en quelques minutes par le stress. Son activité ne requiert pas de synthèse protéique. Des agents chimiques, induisant la réponse au choc thermique, provoquent aussi son activation. L'activation par le choc thermique de cette kinase pourrait provoquer une hyperphosphorylation de l'ARN polymérase II et une modification de son activité. Cette variation d'activité de l'ARN polymérase II pourrait expliquer les modifications d'activités transcriptionnelles observées après le choc thermique.

III. RECOMBINAISON DANS LES CELLULES SOMATIQUES

(Hubert CONDAMINE, Paulo DE SEPULVEDA, Pascal NOUVEL
et Jean-Jacques PANTHIER)

La mise en évidence de recombinaisons mitotiques a pu être effectuée chez la Souris en utilisant les propriétés de mutations au locus W. Ces mutations empêchent le développement normal et/ou la différenciation de trois lignages cellulaires dans l'embryon : le lignage des cellules germinales, celui des mélanoblastes et celui de la lignée érythropoïétique. En conséquence, les souris mutantes sont, à des degrés variables selon les allèles, de fécondité diminuée, dépigmentées et anémiques. Plusieurs allèles sont connus qui entraînent une dépigmentation importante mais sont caractérisés en outre par la présence de tâches de réversion somatique au niveau desquelles la coloration du pelage est normale. Ce phénomène est observé exclusivement chez des hétérozygotes, dans les cellules desquels l'allèle muté coexiste avec le gène sauvage. En utilisant un montage génétique approprié, on a pu montrer que ces tâches sont en fait dues à des recombinaisons mitotiques. Jusqu'à présent, ce type d'événements avait été presque exclusivement observé dans des tissus tumoraux chez les mammifères. Nos observations font penser qu'il s'agit d'un phénomène assez répandu, même si sa mise en évidence *in vivo* est en général difficile, et qui contribue, tout au long de l'embryogénèse et de la vie post-natale, à remodeler le génome des cellules de l'organisme.

IV. ÉTUDE DE L'UVOMORULINE

(Nadine PEYRIÉRAS)

L'uvomoruline, glycoprotéine membranaire de 120 kilodaltons a été identifiée grâce à son rôle dans le phénomène de compaction de l'embryon de Souris. L'uvomoruline fait partie d'une famille de molécules d'adhérence cellulaire appelées cadhérines possédant des homologies de structure et de

fonction et en particulier la propriété de lier le calcium. On distingue les N cadhérine, P cadhérine et E cadhérine (ou uvomoruline) qui sont codées par des gènes distincts et exprimées différemment au cours de l'embryogénèse et chez l'adulte. La mise en évidence de cette famille de gènes impose de préciser les propriétés biochimiques et immunologiques des différentes protéines. La caractérisation de l'uvomoruline a été faite à l'aide d'anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre un fragment N-terminal de la molécule. La réactivité de ces anticorps a été comparée à celle d'anticorps polyclonaux dirigés contre un peptide synthétique choisi dans la région C terminale de la P cadhérine de Poulet (Don de B. Geiger) pour sa conservation aussi bien au sein de la famille qu'entre espèces.

Des immunorépliques réalisées avec ces anticorps à partir d'extraits membranaires de foie, cerveau, poumon, cœur, peau et placenta d'embryons de Souris de 17 jours p.c. montrent que les anticorps anti-peptides ne reconnaissent que très faiblement l'uvomoruline présente dans le foie, le placenta, le poumon et la peau. Les anticorps anti-peptides mettent en évidence au moins 4 cadhérines de migrations électrophorétiques proches mais distinctes de l'uvomoruline. Chaque tissu étudié montre un profil spécifique d'expression des cadhérines avec l'une des formes majoritairement exprimée. Les modifications de ce profil et les modulations de l'adhérence cellulaire sont examinées dans des systèmes de différenciation cellulaire *in vitro* (tératocarcinome (F9, 1009), différenciation hépatique).

ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DU POISSON-ZÈBRE (Hubert CONDAMINE et Jean-Stéphane JOLY)

Le Poisson-Zèbre, ce petit poisson des eaux tropicales, est un vertébré qui se prête particulièrement bien à l'analyse des systèmes génétiques intervenant dans le développement embryonnaire des vertébrés. Le développement de l'embryon est rapide (4 jours). La transparence de l'œuf permet de l'observer aisément au microscope. Par fécondation des œufs avec du sperme irradié, on peut obtenir un début de développement haploïde ou réaliser des embryons homozygotes, d'où une génétique simplifiée. Les premières expériences consistent à mettre au point le système et à commencer l'analyse soit en provoquant des mutations, soit par génétique réverse à l'aide de sondes de *Drosophila*.

PRINCIPALES PUBLICATIONS

J.J. PANTHIER, J.L. GUÉNET, H. CONDAMINE et F. JACOB, *Evidence for mitotic recombination in $W^{e1}/+$ heterozygous mice* (*Genetics*, 125, 175-182, 1990).

O. KELLERMANN, M.H. BUC-CARON, P.J. MARIE, D. LAMBLIN et F. JACOB, *An immortalized osteogenic cell line derived from mouse teratocarcinoma is able to mineralize in vivo and in vitro* (*J. Cell Biol.*, 110, 123-132, 1990).

F. JACOB, *L'unité du vivant* (*Médecine/Sciences*, 6, 222-227, 1990).

V. RICHOUX, J.J. PANTHIER, A-M. SALMON et H. CONDAMINE, *Acquisition of endogenous ecotropic MuLV can occur before the late one-cell stage in the genital tract of SWR/J-RF/J hybrid females* (*J. exp. Zool.*, 252, 96-100, 1990).

H. LE MOUËLLIC, Y. LALLEMAND, et P. BRÛLET, *Targeted replacement of the homeobox gene *Hox-3.1* by the *Escherichia coli* LacZ in mouse chimeric embryos* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4712-4716, 1990).

F. CONQUET et P. BRÛLET, *Developmental expression of myeloid leukemia inhibitory factor gene in preimplantation blastocyst and in extraembryonic tissue of the mouse embryo* (*Mol. Cell. Biol.*, 10, 3801-3805, 1990).

Y. LALLEMAND, et P. BRÛLET, *An in situ assessment of mingling of embryonic stem cells and their descendants in the mouse embryo : implications for chimerism* (*Development*, 110, 1241-1248, 1990).

O. BENSAUDE, M. PINTO, M.F. DUBOIS, V.T. NGUYEN et M. MORANGE, *Protein denaturation during heat-shock and related stress*, chap. 8, pp. 90-99, in « Stress proteins. Induction and function », Schlesinger M.J., Santoro G., Garaci E., eds, Springer Verlag, 1990.

V. LEGAGNEUX, M. MORANGE et O. BENSAUDE, *Heat-shock and related stress enhance RNA polymerase II C-terminal-domain kinase activity in HeLa extracts* (*Eur. J. Biochem.*, 193, 121-126, 1990).